

综述

兔椎间盘退变模型的研究进展

Advances in rabbit model for intervertebral disc degeneration

夏冬冬¹, 林胜磊¹, 王向阳²

(1 温州医学院第二临床医学院; 2 温州医学院附属第二医院骨科 325100 浙江省温州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.06.14

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-06-0556-04

人类多种脊柱疾病例如颈椎病、腰椎间盘突出症等疾病的根本病理变化是椎间盘退变,但其确切病因及病理生理机制目前仍不十分清楚。因此建立椎间盘退变实验动物模型,对深入研究其病因和发生机制是十分重要也是十分必要的。自从 20 世纪三十年代, Lob 在损伤兔椎间盘纤维环后观察到椎间盘产生与人类椎间关节病变相似的变化,到目前为止研究者们根据不同的原理建立了多种兔椎间盘退变的模型。参考 Lotz^[1]对椎间盘退变模型的分类,我们可以把已建立的兔椎间盘退变模型分为:改变力学特性模型、破坏椎间盘组织模型和其他模型,综述如下。

1 改变力学特性模型

1.1 机械压缩法模型

有研究发现超出生理范围的轴向压缩可以明确引起椎间盘的退变^[2],由此提出了以机械载荷因素为始动因素而致使椎间盘退变的概念,即椎间盘的非生理性负荷诱导椎间盘结构损害和一系列细胞介导的不可逆性反应,而这些变化又由于营养代谢通路的薄弱,年龄的变化,修复机制的不完善以及遗传因素等进一步加深椎间盘的退变^[3],因此明确了载荷与椎间盘退变存在着密切的关系。

在兔上建立的模型多是研究静态压缩载荷和椎间盘退变的关系。Kroeber 等^[4]首先在兔腰椎上置入了加压装置,该装置为一自制的通过弹簧产生压力的轴向加压装置,其通过 4 根不锈钢钉(长 80mm,直径 5mm)将装置连接于横穿于兔 L4、L5 椎体的两根克氏针(直径 1.5mm)上,从而通过装置上弹簧的调节来产生对椎间盘的轴向静态加压的效果。实验过程中在其 L4/5 椎间盘分别给以 7d(n=7)、14d(n=7)和 28d(n=7)的轴向加压后取材研究或在 28d(n=7)轴向加压后再撤销加压令其自愈 28d 后取材研究。最终通过椎间盘的高度,髓核和终板的组织,椎间盘细胞的和基因水平的变化发现轴向加压可以引起兔椎间盘的退变。熊鑫茗等^[5]则很好地利用磁共振影像观察椎间盘退变的优势,在 4 个月龄日本大白兔对其腰椎间盘施加

10kg 压力,建立椎间盘退变模型。并用 Thompson 分级法及兔腰椎间盘磁共振(MRI)评价退变程度,HE 染色及 I、II 型胶原免疫组化染色考察其组织学改变,结果发现各组均有不同程度的退变,认为可控轴向压力致兔腰椎间盘退变模型可以高效诱发椎间盘退变,尤其在轻、中度椎间盘退变方面具有优势。在兔腰椎上研究载荷引起椎间盘退变原因探索的研究上,Hee 等^[6]利用类似 Kroeber 所设计的装置在新西兰白兔上建立了模型,该模型着重于载荷对终板的影响,实验发现轴向对椎间盘的加压将导致软骨终板的退变和骨终板中血管的改变,而这两项的改变进一步引起的椎间盘的退变。

Kroeber 等^[7]在研究了轴向压缩与兔椎间盘退变关系后,又研究了轴向拉伸对受压后椎间盘所产生的影响,其将原本装置改为拉伸装置用于已经过轴向加压的椎间盘。实验后发现相比于没有进行轴向拉伸的椎间盘,有拉伸的椎间盘发生了明显的再生重建。这个研究反面论证了机械压力与椎间盘退变的关系,更进一步地将此类机械压缩模型运用到椎间盘治疗的研究中。

1.2 椎体不稳法模型

椎体、椎间盘和脊柱韧带以静力平衡的作用维持关节稳定和平衡,脊柱周围肌肉、肌腱及内压以动力平衡的作用维护关节稳定和平衡,通过手术破坏支持组织如棘上、棘间韧带,棘旁肌肉或棘突等,或外界环境持续对局部肌肉进行刺激,造成椎间盘受力不平衡,而导致异常的生物力学改变可导致椎间盘退变,据此许多研究者建立了椎体不稳而导致椎间盘退变的模型。黄宗强等^[8]取新西兰大白兔,随机分为骨性手术组和软组织手术组。软组织手术组仅骨膜下剥离 L3~L7 的椎旁肌肉;骨性手术组完整切除 L4/5 双侧下关节突和 L5 棘突,保留 L5、L6 上关节突。骨性手术组 L4/5、L5/6 椎间盘为实验组椎间盘,上下相邻的 L3/4、L6/7 为自身对照组椎间盘。软组织手术组 L4/5、L5/6 椎间盘为实验对照组椎间盘。术后 1、2、4 及 8 个月行 MRI 检查。将实验所得的 L3/4、L4/5、L5/6、L6/7 T2WI 轴位像输入电脑,用 KONTRON IBAS2.0 全自动图像分析系统分析图像中高信号区域面积占整个椎间盘面积的百分比(面积分数)并进行统计分析。未手术前发现新西兰大白兔 T2WI

第一作者简介:男(1987-),硕士,研究方向:脊柱外科

电话:13757893038 E-mail:xiadongdong@qq.com

通讯作者:王向阳 E-mail:xiangyangwang@126.com

矢状位像上,髓核呈均一高信号;T2WI 轴位像上,髓核高信号区域位于椎间盘中央,占椎间盘横截面积 50%左右。养殖 1 个月与 8 个月面积分数比较无统计学差异。随着术后时间延长,实验组椎间盘轴位像上面积分数变化显著,自身对照组次之,实验对照组最小,相同时间 3 组之间比较有统计学差异,相同组别术后不同时间比较有统计学差异。从而得出脊柱失稳可以诱发椎间盘退变且髓核 T2WI 轴位像上面积分数减小能够较早反映。

上述实验是通过破坏相应脊柱节段骨性组织的完整性造成相应椎间盘的受力不均从而造成椎间盘的退变,另有研究发现通过将相应节段融合可使相应融合节段的上下椎间盘受力发生改变从而导致退变。Phillips 等^[9]选用 28 只新西兰大白兔,随机取 15 只为实验组,用甲基丙烯酸甲酯与 20G 不锈钢钢丝将其腰椎邻近 L5~L7 水平融合,发现 3 个月后可在其相邻靠近头方向的 L4/5 和靠近尾部方向的 L7/S1 椎间盘出现纤维环板层结构紊乱;6 个月时该变化更加明显,并以内、中层纤维环为最,细胞增殖伴随大量软骨细胞和脊索细胞丧失的现象同时存在;9 个月后纤维环撕裂,椎间盘空间变窄,软骨终板硬化。最终得出对兔脊柱关节融合可建立椎间盘退变模型。Higashino 等^[10]则着眼于融合节段上下椎间盘退变程度的区别,该研究将新西兰大白兔腰椎在 L3、4、5 水平进行融合,在术后 6 个月,12 个月进行 X 线检查、核磁共振检查和组织学检查,发现在 12 个月时发现其相邻靠近头方向的 L2/3 和靠近尾部方向的 L5/6 椎间盘都出现退变,但靠近尾部方向的 L5/6 椎间盘所发生的退变在椎间盘高度、核磁共振影像和组织学检查上的表现都要严重于融合节段其相邻靠近头方向的 L2/3 椎间盘。

2 损伤椎间盘组织模型

2.1 纤维环损伤法模型

纤维环位于髓核外层,主要作用是表达 I 型胶原蛋白、承受机体重力负荷,其外层有起自脊椎动脉的小血管供应,而内层纤维环、髓核通过软骨终板的渗透而获取营养^[11]。通过造成纤维环损伤,引起急性椎间盘突出和髓核压力降低,髓核相对密闭的容积体压力平衡被打破,启动椎间盘退变的级联反应^[1]。Key 等早在 1948 年用手术刀刺穿椎间盘来诱导椎间盘退变。Lipson 等^[12]使用前侧纤维环切开法构建兔椎间盘退变模型。损伤后发现纤维软骨化生和骨赘形成,并发现急性损伤后椎间盘内水、蛋白多糖、透明质酸含量的快速丢失可在短时间内恢复,但后继发生缓慢渐进的丢失被认为是退变的原因。类似 Lipson 的纤维环刀刺伤模型可以分为两类:纤维环全层刀刺伤模型和表层刀刺伤模型。前者由于伤及髓核,椎间盘退变发生发展相对比较迅速,可用于研究退变椎间盘的再生和评估相关治疗方法的疗效;而纤维环表层刀刺伤后发生退变则相对较慢,可能适于研究椎间盘退变的病理生理学过程,但这两种模型的可重复性都相对较差^[13]。相对于刀刺制造纤维

环损伤模型,通过针刺造模则更有优势。Sobajima 等^[14]选用成熟的雌性新西兰大白兔,在其 L2/3、L3、4、L4/5 椎间盘纤维环前外侧用 16G 针头行 5mm 穿刺,其 L1、2、L5/6 椎间盘为阴性对照,在第 3、6、12 和 24 周用磁共振影像检查,观察到针刺椎间盘有缓慢渐进的椎间盘退变征象。Kim 等^[15]研究了不同大小针头针刺和经典的刀刺造模效果的差异,其选用新西兰大白兔使用经典刀刺和 21G、18G 和 16G 针头针刺法制备退变模型。研究发现在经典刀刺造模后 2 周椎间盘就没有了进一步变化,而针刺造模则可观察到缓慢渐进的椎间盘退变征象并且用 18G 和 16G 针头穿刺所造的模型效果更为明显。随后针刺造模的效果被越来越多的研究者认可,越来越多的研究者将此模型运用到椎间盘退变原因、诊断和治疗中去^[16-18],特别是利用 C 型臂 X 线机定位经皮针刺纤维环造模方法的出现^[19]更进一步减小了对实验动物的创伤且提高了造模效果。

2.2 酶化学物质法模型

用酶化学物质注入到兔椎间盘使之产生类似椎间盘退变的效果是许多研究者普遍实用的一种建立椎间盘退变模型的方法。早期研究者们应用髓核化学溶解术的原理,使用木瓜凝乳蛋白酶溶解髓核制备退变动物模型,向髓核内注射最适剂量木瓜凝乳蛋白酶后可观察到椎间盘高度降低,蛋白多糖含量减少,生物力学稳定性丢失。有研究者^[20]将不同剂量软骨素酶 ABC 注入兔椎间盘并在不同时间对其进行影像学、组织学和生物力学等方面的检查。发现自从注射第 1 天起椎间盘的空间就开始出现减少,髓核的重量和水含量在第 3 天开始出现减少,进一步研究显示在 0.0002U/椎间盘的剂量下,第 3 天将出现椎间盘退变的迹象。Imai 等^[21]则在观察椎间盘注射软骨素酶 ABC 造椎间盘退变的基础上探讨了相关的治疗方式,其选用 44 只成熟的雌性新西兰大白兔中的 38 只平均分成两组,一组对其椎间盘注射软骨素酶 ABC(10mU/椎间盘),4 周后再注射 5% 乳糖液(10μl/椎间盘),另一组一组对其椎间盘注射软骨素酶 ABC(10mU/椎间盘),四周后注射每 100μg 加入人重组骨蛋白-1 10μl 的乳糖液,剩余 6 只作为对照组只注射软骨素酶 ABC(10mU/椎间盘)且在四周后处死并作相关检查。每隔 2 周通过 X 线检查观察椎间盘高度,并在注射软骨素酶 ABC 后的 6、8、12 和 16 周处死动物进行进一步组织学和生物力学分析,发现软骨素酶 ABC 可以使兔椎间盘发生明显的退变而人重组骨蛋白-1 具有使退变的椎间盘恢复的作用,此种作用在 12 周后最为明显。

软骨素酶 ABC 注入椎间盘虽然可以形成椎间盘退变。但是经过一段较长的时间后,其造模效果并不持续和明显,而纤维连接蛋白及其片段却没有这方面的缺点,将纤维连接蛋白片段注入兔腰椎间盘可诱导髓核细胞和基质发生渐进的退化性改变,而且这种退变不会随着时间而自然修复。Anderson 等^[22]选用新西兰大白兔对其椎间盘进行纤维结合素碎片(fibronectin fragment)的注射,分别在

2、4、8、12 和 16 周对其进行影像学、组织学、生物力学和基因表达的检查。结果发现在注射纤维结合素碎片 12 周后发现骨赘,8~16 周发现聚集蛋白多糖和 II 型胶原 mRNA 表达下调,16 周见髓核和纤维环渐进性破坏,从而可以认为纤维结合素碎片可以诱发椎间盘渐进性退变且造模效果明显。

3 其他模型

3.1 自然退变模型

探索年龄和椎间盘退变之间的关系一直是研究椎间盘退变的热点。Sowa 等^[23]饲养 4 只成熟的雌性新西兰大耳白兔 122 周,期间对其进行持续的腰椎磁共振检查并最终对其进行椎间盘的组织学检查和基因表达的定量分析并与年轻和成年的兔子相比较。结果发现组织学检查显示了明显的细胞变化,核磁共振影像的改变远慢于损伤模型,髓核的基因表达与损伤模型有着明显的不同。得出年龄的增加也是引起椎间盘退变的一种独立因素。

Sowa 等^[23]的实验虽然发现了随着动物年龄的增加其椎间盘会发生退变,是其观察的动物数量有限并不能十分客观的证实年龄和椎间盘退变的关系。Clouet 等^[24]的实验则在不同时段用多种方法检测实验兔椎间盘,其用 1、6 和 30 月龄的新西兰大耳白兔三组,每组中的 3 只取来进行核磁共振检查和组织学检查,每组中的 5 只进行 RT-PCR 分析。结果从核磁共振的检查分析来看发现兔椎间盘从 1 月龄开始即有发生相当于 Pfirrmann 分级的第 I 级的可观察到的改变,6 月龄的相当于 Pfirrmann 分级的第 II 级,30 月龄的相当于 Pfirrmann 分级的第 III 级;组织学检查得出的从 1 月龄到 30 月龄的 Boos' modified 评分有着明显的增高;转录产物表达的分析发现 COL2A1 和 AGC1 的表达随模型月龄增加而减少而 COL1A1、MMP-13、BMP-2、MGP 和 p21 的表达随着模型月龄增加而增加。从而得出兔的椎间盘随着月龄的增加而发生了明显的组织学上的改变。

3.2 尼古丁法模型

Iwahashi 等^[25]采用 20 只日本大耳白兔(雌性 10 只,雄性 10 只,均重 3~4kg)将起随机分为 2 组,在实验组(雌性 5 只,雄性 5 只)的皮肤下植入一个充满尼古丁稀释溶液的微泵,其可以使兔血尼古丁浓度近似维持在 110ng/ml,这样维持 8 周,另 10 只兔子为对照组。8 周后对实验组椎间盘组织进行病理检查发现椎体软骨终板附近血管芽的密度降低、管腔变窄,并且认为此两种改变将导致椎间盘的血氧分压下降并导致蛋白多糖和胶原的合成降低,最终引起椎间盘退变。

4 展望

对椎间盘退变动物模型的研究的根本目的是在于模拟人椎间盘的退变以助于研究人员去研究揭示阐明人椎间盘退变的发生机制,以期最终获得椎间盘退变的预防和新的治疗策略。故一个好的模型是十分重要的,因此既

利用好兔这一常规用来构建椎间盘退变模型的实验动物其具有的实验周期短、实验结果明显、经济、易于饲养等优点,又要避免模型建立的诸多缺点从而建立一个科学、合理、简便容易而且重复性高的椎间盘退变模型是将来可以努力的方向。

5 参考文献

1. Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: Lessons learned[J]. Spine, 2004, 29(23): 2742-2750.
2. Walsh AJ, Lotz JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading[J]. J Biomech, 2004, 37(3): 329-337.
3. Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it[J]? Spine, 2006, 31(18): 2151-61.
4. Kroeber M W, Unglaub F, Wang H, et al. New in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration and to investigate the effects of therapeutic strategies to stimulate disc regeneration[J]. Spine, 2002, 27(23): 2684-2690.
5. 熊鑫茗, 邵增务, 郭兵, 等. 可控轴向压力致兔腰椎间盘退变模型的建立及评价 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17 (19): 1492-1496.
6. Hee HT, Chuah YJ, Tan BH, et al. Vascularization and Morphological Changes of the Endplate After Axial Compression and Distraction of the Intervertebral Disc[J]. Spine, 2011, 36(7): 505-511.
7. Kroeber MW, Unglaub F, Guehring T, et al. Effects of controlled dynamic disc distraction on degenerated intervertebral discs an in vivo study on the rabbit lumbar spine model [J]. Spine, 2005, 30(2): 181-187.
8. 黄宗强, 刘尚礼, 郑召民. 双侧关节突关节切除诱发椎间盘退变的磁共振计量分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(15): 1175-1177.
9. Phillips FM, Reuben J, Wetzel FT. Intervertebral disc degeneration adjacent to a lumbar fusion: an experimental rabbit model[J]. J Bone Joint Surg Br, 2002, 84(2): 289-294.
10. Higashino K, Hamasaki T, Kim JH, et al. Do the adjacent level intervertebral discs degenerate after a lumbar spinal fusion? an experimental study using a rabbit model [J]. Spine, 2010, 35(22): 1144-1152.
11. 朱洪勋, 韩成龙. 椎间盘退变机制及动物模型建立的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(5): 1814-1816.
12. Lipson SJ, Muir H. Proteoglycans in experimental intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 1981, 6(3): 194-210.
13. 牛朋彦, 熊伟, 李锋. 椎间盘退变模型的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2010, 20(2): 160-163.
14. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-ray, and histology[J]. Spine, 2005, 30(1): 15-24.
15. Kim KS, Yoon ST, Li J, et al. Disc degeneration in the rabbit: a biochemical and radiological comparison between four disc injury models[J]. Spine, 2005, 30(1): 33-37.

16. Chan DD, Khan SN, Ye X, et al. Mechanical deformation and glycosaminoglycan content changes in a rabbit annular puncture disc degeneration model[J]. Spine, 2011, 36(18): 1438-1455.
17. Mwale F, Ciobanu I, Giannitsios D, et al. Effect of oxygen levels on proteoglycan synthesis by intervertebral disc cells [J]. Spine, 2011, 36(2): 131-138.
18. 崔运能, 周荣平, 麦奇光, 等. 肌间隙入路腰椎间盘退变模型的构建[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(3): 404-408.
19. Chun HJ, Kim YS, Kim BK, et al. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs[J]. World Neurosurg, 2012, 78 (3-4): 364-371.
20. Takahashi T, Kurihara H, Nakajima S, et al. Chemonucleolytic effects of chondroitinase ABC on normal rabbit intervertebral discs: course of action up to 10 days postinjection and minimum effective dose[J]. Spine, 1996, 21(21): 2405-2411.
21. Imai Y, Okuma M, An HS, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection in to intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC [J]. Spine, 2007, 32(11): 1197-1205.
22. Anderson DG, Li X, Tannoury T, et al. A fibronectin fragment stimulates intervertebral disc degeneration in vivo [J]. Spine, 2003, 28(20): 2338-2345.
23. Sowa G, Vadalà G, Studer R, et al. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression[J]. Spine, 2008, 33(17): 1821-1828.
24. Clouet J, Pot-Vaucel M, Grimandi G, et al. Characterization of the age-dependent intervertebral disc changes in rabbit by correlation between MRI, histology and gene expression [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 4(12): 147-156.
25. Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al. Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking[J]. Spine, 2002, 27(13): 1396-1401.
- (收稿日期:2012-02-23 修回日期:2012-04-11)
(本文编辑 彭向峰)

消息

第十五届、第十六届全国骨盆与髌臼骨折诊疗新进展学习班通知

由《中华创伤骨科杂志》编辑部和南方医科大学南方医院创伤骨科主办,广州军区武汉总医院承办、华中科技大学同济医学院附属同济医院协办的“第十五届全国骨盆与髌臼骨折诊疗新进展学习班”定于2013年8月2~4日在武汉举行,吉林大学白求恩第一医院承办的“第十六届全国骨盆与髌臼骨折诊疗新进展学习班”定于8月16~18日在长春举行。研讨会将邀请北京积水潭医院王满宜教授、吴新宝教授,解放军总医院唐佩福教授,南方医科大学南方医院余斌教授、王钢教授,河北医科大学第三附属医院张英泽教授,山东省骨科医院周东生教授,温州医学院附属第二医院郭晓山教授,上海交通大学附属第六人民医院孙玉强教授,云南省第二人民医院陈仲教授,大连医科大学附属第一医院汤欣教授,广州军区武汉总医院蔡贤华教授,上海交通大学新华医院陈晓东教授,北京大学人民医院张殿英教授,西安交通大学附属西安红会医院张堃教授,上海第二军医大学长海医院纪方教授,四川大学华西医院王光林教授,华中科技大学同济医学院附属协和医院刘国辉教授,华中科技大学同济医学院附属同济医院易成腊教授等国内外创伤骨科领域、特别是骨盆、髌臼骨折治疗领域的著名专家做专题讲座。本届学习班讲师阵容强大,几乎囊括了国内最著名的创伤骨科和骨盆、髌臼骨折领域的专家,创历次学习班之最。讲课内容广泛,包含了骨盆、髌臼骨折的影像、分型、诊断、入路、复位、内固定、外固定、微创、手术失误原因和治疗的最新进展、数字化应用等最基础和最热门的课题,而且还有 Workshop,手术实况或录像等,相信参加者定会不虚此行。欢迎踊跃投稿或提供疑难病例资料进行现场讨论(稿件可直接发送至:wgfr@163.com)。学习班结束授予国家级继续医学教育 I 类学分 10 分。

有意参会者请务必填写回执寄回或通过电子邮件联系。联系方式:①广州军区武汉总医院刘曦明(13397196338、13397199298、13871167730, E-mail:whzyygk@163.com; 吉林大学白求恩第一医院马玥(13844082909, E-mail:jdyyc@sina.com), ②广州南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部(电话:020-61641748 E-mail:chinjot@yahoo.com.cn)。会议地址:①武汉中南花园饭店(湖北省武汉市武昌区武珞路 558 号);②开元名都大酒店(长春市绿园区景阳大路 2299 号)。